

文章编号:1005-6947(2005)02-0142-04

· 简要论著 ·

原发性肝细胞癌、癌旁及肝硬化组织中 CD 3 + 细胞的研究

陈昱, 罗殿中, 李萍, 郭芳

(广西医科大学 病理教研室, 广西 南宁 530021)

摘要:为探讨 CD3 在原发性肝细胞癌、癌旁、肝硬化及正常肝组织中的表达,并探讨 CD 3 + 细胞与肝癌、肝硬化的关系。笔者对 60 例原发性肝细胞癌组织、62 例单纯性肝硬化及 21 例正常肝组织,用 SP 免疫组化法进行染色,定量分析其阳性细胞数。结果示:(1)CD 3 + 细胞平均数从高到低依次为:肝癌癌旁组织、癌组织、肝硬化及正常肝组织($P < 0.05$);(2)肝癌组织中 CD 3 + 细胞平均数与组织学分级和临床 TNM 分期无关;(3)肝癌 15 个月内有转移组的癌组织中 CD 3 + 细胞数少于无转移组($P < 0.01$)。提示 CD 3 + 细胞可作为反映机体抗肿瘤免疫状态及判断患者预后的重要指标。

关键词:肝肿瘤/病理学;肝细胞癌/病理学;肝硬化/病理学;CD 3 + 细胞

中图分类号:R735.7;R730.261

文献标识码:B

淋巴细胞是构成机体免疫系统的重要组成部分,主要有 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞等细胞亚群。T 淋巴细胞是细胞免疫的主要效应细胞,其在细胞免疫乃至整个免疫系统中有举足轻重的地位^[1]。CD3 分子分布于所有成熟的 T 细胞表面,至少由 $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta$ 5 种多肽链组成,与 T 细胞抗原受体非共价连接。CD3 单克隆抗体可诱导 CD3 多肽和 TCR 形成共帽(co-capping),并诱导 T 淋巴细胞活化。因此通过检测 T 细胞的数量,可了解机体的抗肿瘤细胞免疫功能状态^[2]。本研究旨在探讨肝癌、肝硬化组织中的 CD3 的表达情况,并分析 CD 3 + 细胞与肝癌预后的关系,从而研究肝癌患者的局部免疫状态。

1 材料与方 法

1.1 标本分组

1.1.1 原发性肝细胞癌组 60 例。均为广西医

科大学第一附属医院 2002 年 5 月~2003 年 1 月手术切除标本,为病理学检查证实。男 57 例,女 3 例;年龄 23~73(平均 46.9 ± 11.8)岁。甲胎蛋白(AFP)阳性 38 例,阴性 22 例。术后均继续进行以化疗为主的综合治疗。肝细胞癌分级按照世界卫生组织(WHO)的标准分为高分化(G1 级)、中分化(G2 级)和低分化(G3 级)三级^[3],本组 G1 级 3 例,G2 级 38 例,G3 级 19 例。肝细胞癌按国际 TNM 分期分为 I, II, III, IV 期^[3];其中 I 期 3 例,II 期 28 例,III 期 11 例,IV 期 18 例。追踪 15 个月,转移复发情况由病理学和临床决定^[4]。失访 6 例。有转移复发者 25 例,无转移复发者 29 例。

1.1.2 癌旁组织组 60 例。为距癌结节 2cm 以上的肝组织,其中伴肝硬化 46 例,无肝硬化 14 例。

1.1.3 肝硬化组 62 例。男 47 例,女 15 例,年龄 15~74(平均 43.0 ± 12.0)岁。

1.1.4 正常肝组织组 21 例。标本取自肝血管瘤手术标本中的周围正常肝组织;男 9 例,女 12 例,年龄 26~67(平均 44.5 ± 11.8)岁。

1.2 试剂

免疫组化 SP 试剂盒,一抗鼠抗人 CD3 单抗为美国 MAXIM 公司产品。

1.3 方法

基金项目:广西科学基金资助项目(0342021)。

收稿日期:2004-10-07; **修订日期:**2004-12-01。

作者简介:陈昱(1977-),男,湖南湘潭人,广西医科大学博士研究生,主要从事临床病理诊断,病理学教学和科研工作方面的研究。

通讯作者:罗殿中 电话:13367805929(手机); E-mail: luodianzhong@yahoo.com.cn。

每例标本分别进行两种处理:(1)常规切片 HE 染色复查诊断;(2)用于免疫组织化学(免疫组化)染色的标本按如下方法处理。10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋;切片厚 3 ~ 4 μm ,贴在预先涂有多聚赖氨酸的干净载玻片上,放入 55 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱 24h 以上,至染色时取出,以防止脱片。常规 SP 法染色:每张切片加 1 滴过氧化物酶阻断溶液,以消除内源性过氧化物酶的活性,室温孵化 10 min, PBS 液冲洗 3 \times 3 min;热抗原修复处理, PBS 液冲洗 3 \times 3 min;加非免疫动物血清,室温孵育 10 min,以减少非特异性背景;倾去血清,勿洗,滴加 1 滴一抗 CD3,室温孵育 60 min, PBS 液冲洗 3 \times 3 min;每张切片滴加 1 滴生物素标记的二抗,室温孵育 15 min, PBS 液冲洗 3 \times 3 min;甩去 PBS 液,每张切片滴加 1 滴链霉素抗生物素蛋白——过氧化物酶溶液,室温孵育 15 min, PBS 液冲洗 3 \times 3 min; DAB 显色,苏木素复染,脱水,干燥,透明,中性树胶封固,光学显微镜观察。设立对照:以已知淋巴结阳性切片为阳性对照;以 PBS 代替第一抗体为阴性对照。

1.4 结果判定

细胞膜及细胞浆内若出现棕黄色信号为阳性

细胞,呈圆形或者椭圆形。由于 CD 3 + 细胞在肝组织中分布的不均衡性,CD 3 + 细胞的计量采用三种不同的计数方法:随机 CD 3 + 细胞平均数[随机观察至少 10 个高倍镜(10 \times 40)视野]、纤维组织中 CD 3 + 细胞平均数[至少随机观察 10 个纤维组织中视野]、肝细胞中 CD 3 + 细胞平均数[至少随机观察 10 个肝细胞中视野]。

1.5 统计学分析

应用 SPSS10.0 统计软件对数据进行 *t* 检验及秩和检验,以 $P < 0.05$ 判为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 CD 3 + 细胞在各种组织中的分布情况

正常肝组织中,CD 3 + 细胞散在分布于肝小叶的肝窦中,汇管区稍密集;单纯性肝硬化中 CD 3 + 细胞主要密集分布在假小叶周围增生的纤维组织及汇管区内,肝细胞间的肝窦中也有少量分布(图 1);癌与癌旁组织中 CD 3 + 细胞亦是密集在间质纤维组织内,部分散布在癌旁的肝窦及癌组织的血窦内(图 2)。

图 1 肝硬化组织中的 CD 3 + 细胞($\times 100$)

图 2 HCC 中的 CD 3 + 细胞($\times 400$)

2.2 不同计数方法 CD 3 + 细胞在肝组织中的分布情况

2.2.1 随机 CD 3 + 细胞平均数的分布情况 癌旁组织最高,为 $(80.21 \pm 23.48)/\text{HP}$;癌组织为 $(60.51 \pm 18.93)/\text{HP}$;肝硬化组织为 $(52.98 \pm$

$18.65)/\text{HP}$,正常肝组织最低,为 $(45.41 \pm 11.65)/\text{HP}$ 。各组相比差异均有显著性($P < 0.05$)。

2.2.2 纤维组织中 CD 3 + 细胞平均数的分布情况 癌旁组织最高,为 $(143.34 \pm 46.31)/\text{HP}$;癌组

织为 $(107.86 \pm 35.04)/HP$;肝硬化组织为 $(89.59 \pm 37.02)/HP$;正常肝组织最低,为 $(76.08 \pm 23.05)/HP$ 。各组相比差异均有显著性($P < 0.05$)。

2.2.3 肝细胞中 CD 3+ 细胞平均数的分布情况
癌组织 $(9.15 \pm 8.06)/HP$,癌旁组织 $(11.38 \pm 5.48)/HP$,肝硬化组织 $(12.41 \pm 6.63)/HP$,正常肝组织 $(10.26 \pm 4.50)/HP$;各组相比差异均无显著性($P > 0.05$)。

2.3 CD 3+ 细胞计数与组织学分级的关系

肝癌组织及癌旁组织各组织学分级的随机 CD 3+ 细胞平均数、纤维组织中 CD 3+ 细胞平均数和肝细胞中 CD 3+ 细胞平均数相比差异均无显著性($P > 0.05$)。

2.4 CD 3+ 细胞计数与临床 TNM 分期的关系

临床分期肝癌组织随机 CD 3+ 细胞平均数 III, IV 期 $[(62.54 \pm 22.16)/HP]$ 高于 I, II 期 $[(58.60 \pm 15.45)/HP]$;癌旁组织 III, IV 期 $[(84.54 \pm 22.28)/HP]$ 高于 I, II 期 $[(76.16 \pm 24.20)/HP]$,但差异均无显著意义($P > 0.05$)。肝癌组织纤维组织中 CD 3+ 细胞平均数 III, IV 期 $[(108.48 \pm 21.42)/HP]$ 高于 I, II 期 $[(103.40 \pm 18.42)/HP]$,癌旁组织 III, IV 期 $[(136.58 \pm 14.78)/HP]$ 高于 I, III 期 $[(129.23 \pm 21.18)/HP]$,但差异均无显著意义($P > 0.05$)。肝细胞中 CD 3+ 细胞平均数与临床分期无明显关系。

2.5 CD 3+ 细胞计数与转移复发的关系

15 个月内有转移复发的癌组织中随机 CD 3+ 细胞平均数 $(53.08 \pm 15.97)/HP$ 少于无转移复发组的 $(65.5 \pm 21.11)/HP$ ($P < 0.05$)。癌组织纤维组织中 CD 3+ 细胞平均数 $(101.16 \pm 14.32)/HP$ 少于无转移复发组的 $(126.34 \pm 21.11)/HP$ ($P < 0.05$)。癌旁组织转移组随机 CD 3+ 细胞平均数 $(75.69 \pm 25.58)/HP$ 小于无转移组的 $84.45 \pm 23.17/HP$,但两组相比差异无显著性($P > 0.05$)。癌旁组织有转移的纤维组织中 CD 3+ 细胞平均数 $(140.81 \pm 23.25)/HP$ 小于无转移组的 $(151.98 \pm 21.34)/HP$,差异亦无显著性($P > 0.05$)。肝细胞中 CD 3+ 细胞平均数与转移复发亦无明显关系。

3 讨论

CD3 是成熟 T 细胞的共同分化抗原,表达于所有成熟的 T 细胞表面,代表组织内总的 T 淋巴细胞^[1]。T 细胞是一类重要的免疫活性细胞,包含 2 个 T 细胞亚群(CD4 + 细胞和 CD8 + 细胞)。CD8 + 细胞可通过细胞毒作用攻击清除肿瘤细胞,其对靶细胞的识别与杀伤受 MHC-I 类抗原的限制。这类细胞主要是 CD 3+, CD4⁻, CD8 + 的细胞。一部分 CD4 + 细胞释放出 T 细胞生长因子,能促进 T 细胞浸润;一部分 CD 3+, CD4 +, CD8 - 的细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤受 MHC-II 类抗原的限制,杀伤带有相同等位型 MHC-II 类抗原的肿瘤细胞。T 细胞除直接介导细胞免疫功能外,对机体免疫应答的调节起关键作用。近年来,也有大量证据表明 T 淋巴细胞对肿瘤细胞具有杀伤作用。在肿瘤免疫过程中,无论是肿瘤抗原的识别、呈递以及各种淋巴因子的分泌,T 淋巴细胞都担负着极其重要的作用^[5]。因此肝脏组织中的 CD 3+ 细胞浸润,可能是局部免疫调节作用的结果。

研究^[6]显示,有一类 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞其表面同时表达 CD3 和 CD56 分子,绝大多数不表达 CD4 及 CD8 分子,这类细胞称为自然杀伤 T(NKT)细胞。有研究^[7]表明,肝脏内 NKT 细胞约占肝内淋巴细胞总数的 20% ~ 30%,被认为在抗肿瘤的发生和转移中发挥重要作用。本研究的 CD 3+ 细胞包括了 CD4 + 细胞、CD8 + 细胞和 NKT 细胞,但仅对 T 细胞进行了一种标记,未能明确具体的 T 细胞的种类和分布。如何用免疫组化的方法观察各种 T 细胞的分布和数量,还有待探讨。

本研究可见,CD 3+ 细胞明显地集中在间质尤其是纤维组织中,肝细胞中只有散在的分布,且其 CD 3+ 细胞数在不同疾病、肝癌的组织学分级、临床分期以及转移情况中均无统计学意义。说明发挥细胞免疫作用的 T 细胞主要在间质中。其中随机 CD 3+ 细胞平均数和纤维组织中 CD 3+ 细胞数

在单纯性肝硬化组中高于正常组,说明肝硬化中有一定的炎症反应,代表患者对局部抗原刺激的免疫反应。在肝癌组织中,肿瘤细胞产生肿瘤特异性抗原刺激肿瘤特异性 T 细胞生成,故肝癌组织的 CD3+ 细胞数量明显高于肝硬化组及正常肝组织组。癌灶中央有部分组织血供差,常有缺血坏死。尽管任何非机体正常物质对机体而言均是抗原,但只有大分子的抗原才能启动淋巴细胞活化和抗体反应成为免疫原。当癌细胞被完全摧毁并彻底碎裂时,其抗原也减少,使免疫细胞对其趋化性减弱;而肿瘤周围则血供丰富,炎症反应明显,故癌组织中 CD3+ 细胞少于癌旁组织。此结果与巴明臣^[8]等人的研究结果一致。笔者还认为,肿瘤组织 CD3+ 细胞浸润多少,血液供应是一重要因素;此外,可能与肿瘤细胞抗原性强弱有很大关系。尽管肿瘤细胞与 T 淋巴细胞空间关系密切,但未发现二者交界处有肿瘤细胞坏死现象。这提示 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤可能不是通过直接接触,而是通过释放淋巴因子等途径实现的。肿瘤周围组织细胞生长活跃,其抗原性较强,而肿瘤中心组织肿瘤细胞处于衰退期,或已经坏死,抗原性较差,因此肿瘤周围组织 CD3+ 细胞明显高于肿瘤实质组织和中心坏死组织。

肝癌组织及癌旁组织中各组织学分级的阳性细胞数之间差异均无显著性($P > 0.05$),提示 CD3+ 细胞与肿瘤的分化程度无明显关系。临床分期肝癌组织 III, IV 期高于 I, II 期,癌旁组织 III, IV 期也高于 I, II 期,但差异均无显著意义($P > 0.05$)。在 60 例肝癌患者中,淋巴结转移和远处转移很少(淋巴结转移者 5 例,远处转移者 2 例),而临床分期主要由肿块大小、结节数量、是否侵犯血管等因素决定;III, IV 期的 CD3+ 细胞稍高,可能与肿块大,结节多则局部抗原相对多有关。15 个月内转移复发组癌组织中 CD3+ 细胞数少于无转移复发组($P < 0.05$),说明转移复发组的细胞

免疫状态差于无转移复发组。以上结果表明,CD3+ 细胞与预后有着密切的关系,是较好的判断预后的指标。

综上所述,CD3 阳性细胞代表了 T 淋巴细胞和 NKT 细胞的数量,亦部分反映了肝癌患者的局部免疫状态。随着肿瘤的逐步发展,CD3+ 细胞数有下降趋势。但本实验仅进行了 CD3 一种标记,有一定局限性。如果能对 T 细胞进行多抗体标记,并研究其数量与肿瘤分期的关系,则能更好地反映机体对肿瘤的细胞免疫状况。

参考文献:

- [1] 曹志新,陈孝平,吴在德. 肝癌合并肝硬化患者脾脏 T 细胞亚群免疫状态的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(6): 361-363.
- [2] 宋京翔,李国新,王小林,等. 早期乳癌患者机体免疫功能变化的临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(6): 369-371.
- [3] 王英,崔忠,李开宗,等. 肝细胞肝癌中 p15 基因产物的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(7): 540-542.
- [4] 周奇,王广田,梁力建,等. Cyclin E 在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(3): 193-195.
- [5] 郭雅,彭民浩,黎乐群. 生长激素对肝癌切除后患者免疫功能及预后的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(3): 163-165.
- [6] Norris S, Collins C, Doherty DG, *et al.* Resident human hepatitis lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes [J]. *Hepatology*, 1998, 28(1): 84-96.
- [7] Eberl G, Lees R, Smiley ST, *et al.* Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NKT cells [J]. *J Immunology*, 1999, 162: 6410-6419.
- [8] 巴明臣,何生. 原发性肝细胞癌不同部位肿瘤浸润性淋巴细胞得率及成活率[J]. 中国普通外科杂志, 1999, 8(2): 133-134.